

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

(22) Date de dépôt 28 mars 1969, à 15 h 13 mn.
(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 47 du 24-12-1970.

(51) Classification internationale (Int. Cl.) A 61 k 27/00//C 07 c.
(71) Déposant : Société dite : E. R. SQUIBB & SONS, INC., résidant aux
États-Unis d'Amérique.

Mandataire : Cabinet Beau de Loménie, Ingénieurs-Conseils, 55, rue
d'Amsterdam, Paris (8^e).

(54) 16 α -D-glucosides de 16 α ,17-dihydroxystéroïdes utiles comme
oestrogènes en médecine vétérinaire et leur procédé de préparation.

(72) Invention :

(33) (32) (31) Priorité conventionnelle :

La présente invention concerne de nouveaux dérivés de stéroïdes qui sont des 16 α - α -D-glucosides de stéroïdes contenant des groupes hydroxy dans les positions 16 α et 17. On prépare les nouveaux composés en faisant réagir ces stéroïdes avec un polysaccharide ou un oligosaccharide en présence d'une source d'amylase ou de transglycosylase.

Parmi les stéroïdes que l'on peut utiliser pour préparer les nouveaux composés selon l'invention, on peut citer tous les stéroïdes ayant des groupes hydroxy en positions 16 α - et 17. Ces stéroïdes comprennent l'oestriol ou $\Delta^{1,3,5(10)}$ -oestratriène-3,16 α ,17 β -triol, la 16 α -hydroxy-testostérone, la 16 α -hydroxy-A-nortestostérone, la 16 α -hydroxy-19-nortestostérone, le 17-épioestriol ou $\Delta^{1,3,5(10)}$ -oestratriène-3,16 α ,17 α -triol ou l'un des composés voisins ayant divers substituants dans des positions autres que 16 α et 17, par exemple la 9 α -fluoro-11 β ,16 α -dihydroxy-testostérone.

On fait réagir ces stéroïdes avec un polysaccharide ou un oligosaccharide tel que saccharose, lactose, cellobiose, amidon, dextrine et panose, et de préférence le maltose, en présence d'une source d'amylase ou de transglycosylase. Les sources de cet enzyme comprennent l'enzyme purifié proprement dit, les préparations d'amylase fongiques telles que celles obtenues par culture de divers champignons tels qu'Aspergillus niger et Aspergillus oryzae, les sources d'enzymes du commerce telles que clarase (Takamine) et Rhozyme-S (rendu par Rohm et Haas) ainsi que la préparation d'amylase obtenue à partir de toutes autres sources connues, par exemple les sources microbiennes animales et végétales.

Pour préparer les nouveaux composés selon l'invention, on mélange le stéroïde et le polysaccharide (ou oligosaccharide) en présence de la source d'enzyme. On effectue la réaction dans un milieu aqueux de préférence à un pH compris entre environ 3,5 et environ 6,5 et de préférence entre environ 4,5 et 5,5, qui peut être maintenu au moyen d'un système tampon, tel que le tampon de Mc Ilvaine (pH 5), à la température normale par exemple entre environ 20 et environ 45°C et de préférence entre environ 30 et environ 37°C.

La réaction fournit le 16 α - α -D-glucoside désiré du stéroïde de départ. Ces glucosides sont des composés nouveaux doués d'activité œstrogène. On peut donc les utiliser de la même manière et pour les mêmes buts que les œstrogènes connus, la dose étant ajustée en fonction de l'activité du composé particulier. En particulier, on peut utiliser les composés selon l'invention pour inhiber l'ovulation chez les animaux à sang chaud

(mammifères) tels que les rongeurs, chiennes, vaches et brebis, par administration parentérale à des doses journalières de 0,1 à environ 100 mg. On peut aussi les utiliser comme agents antifertilité pour accélérer le transport des ovules, inhiber la nidation ou induire la résorption du foetus chez les souris, les rates et les lapines à des doses journalières ou unique de 0,1 à environ 10 mg.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

10 EXEMPLE 1

Oestriol-16 α - α -D-glucoside

a) Préparation de l'enzyme :

On fait pousser Aspergillus niger NRRL 337 sur une tranche de gélose de milieu de Czapek pendant 1 semaine à 25°C. On met en suspension les spores dans 5 ml d'une solution aqueuse à 0,01 % de laurylsulfate de sodium et on utilise cette suspension pour inoculer 10 fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant chacune 100 ml du milieu stérile suivant :

	Farine de maïs	20 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
20	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g
	CaCO ₃	5 g
	Eau	1 litre

On incube les fioles sur une secoueuse (100 cycles par minute, course de 5,08 cm) pendant 64 heures à 30°C, et une croissance abondante de mycelium apparaît. On filtre la culture et on utilise le filtrat contenant l'amylase pour la synthèse décrite à l'étape b.

b) Synthèse enzymatique d'oestriol-16 α - α -D-glucoside

A 500 ml de filtrat de culture obtenu dans l'étape a ci-dessus on ajoute 10 g de maltose dissous dans 200 ml d'eau et 100 ml de tampon de Mc Ilvaine à pH 5,0. On dissout 100 mg d'oestriol dans 100 ml d'acétone aqueuse 50 : 50 et on l'ajoute également au filtrat. On fait incuber le mélange réactionnel à 30°C pendant 16 heures et on peut mettre en évidence la formation de l'oestriol glucoside de la manière suivante.

On extrait 1 ml du mélange réactionnel par trois fois 2 ml d'acétate d'éthyle. On combine les extraits d'acétate d'éthyle, on évapore siccité sous vide et on dissout la moitié du résidu dans un mélange d'acé-

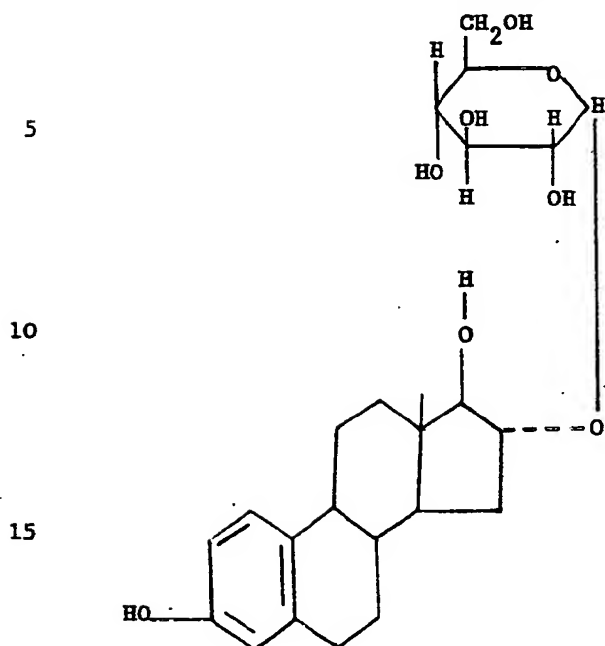
tone et eau 50 : 50 et on effectue la chromatographie sur une feuille de chromatogramme Eastman avec un mélange chloroforme-méthanol (8 : 1) comme solvant de développement. Le glucoside d'oestriol se déplace avec un R_f de 0,15 tandis que l'oestriol non transformé a un R_f de 0,79. On peut
5 déceler les deux taches par leur absorption dans l'ultraviolet ou leur réaction avec l'acide phosphomolybdique. Dans les chromatogrammes sur papier, en utilisant le système acétate d'éthyle-eau, dans lesquels on imprègne le papier par l'eau en le trempant dans un mélange eau-acétone 1 : 3 et on évapore l'acétone à l'air, le glucoside d'oestriol se déplace
10 avec un R_f de 0,35 et l'oestriol avec un R_f de 0,95. On peut utiliser le réactif de Kieffer au ferricyanure ferrique comme réactif de pulvérisation.

c) Isolement et caractérisation de l'oestriol-16 α -D-glucoside

On agite 1 litre du mélange réactionnel obtenu dans l'étape b
15 avec 4 g de charbon actif pendant 1 h. Après filtration et lavage avec un faible volume d'eau on agite le charbon quatre fois pendant 30 mn, chaque fois avec des portions de 40 ml d'un mélange acétone-eau 50 : 50, en séparant le charbon à chaque fois par filtration. On réunit l'éluat d'acétone aqueuse, qui contient alors l'oestriol-glucoside et l'oestriol
20 non transformé, on le répartit entre le benzène et l'éluat d'acétone aqueuse à volumes égaux. On répète la distribution avec du benzène en équilibrant le benzène avec un gaz volume de mélange d'acétone et eau 50 : 50. La majeure partie de l'oestriol non transformé se trouve alors dans la phase benzénique tandis que l'oestriol-glucoside reste totalement dans la phase
25 d'acétone aqueuse.

On concentre la phase d'acétone aqueuse sous vide et on la soumet à la chromatographie sur couche mince de gel de silice GF en utilisant une plaque de 40,64 cm x 20,32 cm. Le solvant de développement et la phase supérieure d'un mélange acétate d'éthyle-n-butanol-eau 4 : 1 : 1.
30 On élue la bande absorbant faiblement dans l'ultraviolet a un R_f de 0,35 avec un mélange acétone-eau 50 : 50. On extrait l'éluat quatre fois par son volume d'acétate d'éthyle. En évaporant à siccité sous vide la phase d'acétate d'éthyle on obtient l'oestriol glucoside cristallisé. On le recristallise plusieurs fois dans un mélange méthanol acétate d'éthyle pour
35 obtenir environ 10 g d'oestriol 16 α -D-glucoside pur, F environ 255-257°C; $[\alpha]_D^{23} = +143^\circ$ (méthanol). Spectre UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 281 m μ ($\epsilon = 2190$), 286 m μ ($\epsilon = 2000$) spectre IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3 485, 3 360, 1 604, 1 575, 1 498 cm^{-1} ; analyse C 64,24 % (calculé 64,00), H 7,70 % (calculé 7,57); solubilité dans l'eau 0,13 mg/ml.

Le produit obtenu répond à la formule suivante :



20 EXEMPLE 2

En suivant le procédé de l'exemple 1, mais en remplaçant le filtrat de culture de l'étape b par 400 mg de l'une des préparations commerciales suivantes d'amylase fongique, clarase (Takamine) et Rhozyme-S (Rohm et Haas) on obtient le même produit.

25

EXEMPLE 3

16α-hydroxytestostérone-16α-O-β-D-glucoside

En suivant le procédé de l'exemple 1 mais en remplaçant l'oestriol dans l'étape b par 100 mg de 16α-hydroxytestostérone on obtient le

30 16α-hydroxytestostérone-16α-O-β-D-glucoside.

EXEMPLE 4

En suivant le procédé de l'exemple 1 mais en remplaçant le maltose dans l'étape b par 10 g de l'un des polysaccharides suivants,

35 amidon, destrine et panose, on obtient le même produit.

EXEMPLE 516 α -hydroxy-A-nortestostérone-16 α - α -D-glucoside

En suivant le procédé de l'exemple 1 mais en remplaçant
l'oestriol dans l'étape b par 100 mg de 16 α -hydroxy-A-nortestostérone,
5 on obtient le 16 α -hydroxy-A-nortestostérone-16 α - α -D-glucoside.

EXEMPLE 616 α -hydroxy-19-nortestostérone-16 α - α -D-glucoside

En suivant le procédé de l'exemple 1 mais en remplaçant
10 l'oestriol dans l'étape b par 100 mg de 16 α -hydroxy-19-nortestostérone,
on obtient le 16 α -hydroxy-19-nortestostérone-16 α - α -D-glucoside.

EXEMPLE 717-épioestriol-16 α - α -D-glucoside

15 En suivant le procédé de l'exemple 1 mais en remplaçant
l'oestriol dans l'étape b par le 17-épioestriol, on obtient le 17-épioes-
triol-16 α - α -D-glucoside.

REVENDICATIONS

- 1 - Un 16α - α -D-glucoside de 16α ,17-dihydroxy-stéroïde
5 utile comme oestrogène en médecine vétérinaire.
- 2 - Le composé selon la revendication 1 dans laquelle le stéroïde est l'oestriol.
- 3 - Le composé selon la revendication 1 dans lequel le stéroïde est la 16α -hydroxytestostérone.
- 10 4 - Le composé selon la revendication 1 dans lequel le stéroïde est la 16α -hydroxy-A-nortestostérone.
- 5 - Le composé selon la revendication 1 dans lequel le stéroïde est la 16α -hydroxy-19-nortestostérone.
- 15 6 - Le composé selon la revendication 1 dans lequel le stéroïde est le 17-épioestriol.
- 7 - Les compositions pharmaceutiques vétérinaires contenant l'ingrédient actif selon la revendication 1 en association avec un support pharmaceutiquement acceptable.
- 20 8 - Les formes d'administration des compositions selon la revendication 8 pour le contrôle de la fertilité chez les mammifères, à des doses journalières ou en dose unique de 0,1 mg à environ 10 mg.
- 9 - Un procédé de préparation d'un composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait réagir un polysaccharide ou un oligosaccharide avec 16α ,17-dihydroxy-stéroïde en présence d'une source
25 d'amylase ou de transglucosylase.
- 10 - Le procédé selon la revendication 9, dans lequel le polysaccharide est le maltose.
- 11 - Le procédé selon la revendication 10, dans lequel le stéroïde est l'oestriol.
- 30 12 - Le procédé selon la revendication 10, dans lequel le stéroïde est la 16α -hydroxytestostérone.

THIS PAGE BLANK (USPTO)